

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-072492

(43)Date of publication of application : 17.03.1998

(51)Int.Cl.

C07K 7/08

A61K 38/00

C07H 21/04

C12N 15/09

C12P 21/02

(21)Application number : 08-231807

(71)Applicant : HOKURIKU SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 02.09.1996

(72)Inventor : WATANABE YOSHINARI

KIMURA TATSUYA

KABURAKI HIROSHI

TOKUYAMA SAYURI

(54) PEPTIDE COMPOUND

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a peptide compound having affinity for thrombopoietin receptor and useful as an active ingredient for medicines for preventing and treating diseases caused by abnormality of hematopoietic process due to megakaryocyte, e.g. diseases accompanied by thrombocytopenia.

SOLUTION: This peptide is specified by the amino acid sequence H-Leu- GlnGly-Cys-Thr-Leu-Arg Ala-Trp-Arg Ala-Gly-Met-Cys-OH and has affinity for a peptide having a cyclic structure in which two cysteine residues contained in the amino acid sequence are bonded by disulfide and for a thrombopoietin receptor.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

•
[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-72492

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月17日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 7/08			C 0 7 K 7/08	
A 6 1 K 38/00	ABY		C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 H 21/04			C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 15/09			A 6 1 K 37/02	ABY
C 1 2 P 21/02		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 10 頁)				

(21) 出願番号 特願平8-231807

(22) 出願日 平成8年(1996) 9月2日

(71) 出願人 000242622

北陸製薬株式会社

福井県勝山市猪野口37号1番地1

(72) 発明者 渡辺 良成

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72) 発明者 木村 達也

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72) 発明者 蕪城 博

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(74) 代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド化合物

(57) 【要約】

【解決手段】 アミノ酸配列: H-Leu-Gln-Gly-Cys-Thr-Leu-Arg-Ala-Trp-Arg-Ala-Gly-Met-Cys-OH により特定されるペプチド、該アミノ酸配列中に含まれる2個のシステイン残基がジスルフィド結合した環状構造のペプチド、及びトロンボポエチンレセプターに親和性を有する上記の各ペプチド、並びにこれらの各ペプチドを含む医薬。

【効果】 トロンボポエチンレセプターに親和性を有しており、巨核球による造血過程の異常に起因する疾患、例えば血小板減少を伴う疾患の予防・治療薬の有効成分として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミノ酸配列：H-Leu-Gln-Gly-Cys-Thr-Leu-Arg-Ala-Trp-Arg-Ala-Gly-Met-Cys-OHにより特定されるペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載のアミノ酸配列中に含まれる2個のシステイン残基がジスルフィド結合した環状構造のペプチド。

【請求項3】 トロンボポエチンレセプターに親和性を有する請求項1又は2に記載のペプチド。

【請求項4】 請求項1に記載のアミノ酸配列において1若しくは2以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び/若しくは欠失が存在しており、かつ、トロンボポエチンレセプターに親和性を有するペプチド、又は該ペプチドに含まれるシステイン残基から選ばれる2個のシステイン残基がジスルフィド結合した環状構造のペプチド。

【請求項5】 請求項1ないし4のいずれか1項に記載の上記の各ペプチドをその部分として含み、トロンボポエチンレセプターに親和性を有するペプチド。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれか1項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項7】 DNAである請求項6に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】 請求項7に記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項9】 請求項8に記載の形質転換体を培養して得られる培養物から該ペプチドを分離・採取する工程を含む請求項1ないし5のいずれか1項に記載のペプチドの製造方法。

【請求項10】 請求項1ないし5のいずれか1項に記載のペプチドを有効成分として含む医薬。

【請求項11】 有効成分である該ペプチドとともに製剤用添加物を含む医薬組成物の形態の請求項10に記載の医薬。

【請求項12】 巨核球による造血過程の異常に起因する疾患の予防及び/又は治療に用いる請求項10又は11に記載の医薬。

【請求項13】 該疾患が血小板減少を伴う疾患である請求項12に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は医薬の有効成分として有用なペプチド化合物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 血小板は、生体の止血、血栓形成において主要な役割を果たす血液有形成分であり、骨髓幹細胞から巨核球前駆細胞を経て骨髓で分化、成熟して生じる巨核球から血中に放出される。血小板は血中で約10日程度の寿命を有しており、その数は長期にわたって一定の値に保たれる。巨核球による造血過程を制御する主要な

因子であるトロンボポエチンをコードする遺伝子が最近クローニングされた (deSavoye et al., Nature, Vol. 369, pp. 533-538)。トロンボポエチンは332個のアミノ酸からなるポリペプチドサイトカインであり、c-mplがコードするタンパク質 (MPL: トロンボポエチンレセプター) のリガンドとして作用し、MPLに結合することによって巨核球前駆細胞から巨核球細胞への増殖と分化成熟を刺激するとともに、血小板産生を増加させる (Kauschansky et al., Nature, Vol. 369, 568-571)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 巨核球による造血過程を調節する生理活性物質は、血液疾患などに対する予防・治療薬として有用であることが期待されている。しかしながら、トロンボポエチンなどの高分子量ポリペプチドを有効成分として含む均一な品質の医薬を安定に供給することは容易ではない。そこで、トロンボポエチンと同様の生理作用を有する低分子量の化合物の提供が求められている。このような化合物のうち、経口投与が可能であり、かつ抗体産生などの副作用のない化合物は、巨核球による造血過程の異常に起因する疾患、例えば血小板減少症などの治療や予防に有用であることが期待される。なお、最近、赤血球増殖因子であるエリスロポエチン (EPO, 165アミノ酸) をモデルとした14アミノ酸からなる環状ペプチドのコンセンサス配列が報告されたが、トロンボポエチンについて同様の報告はない (Science, 273, 458-463, 1996)。

【0004】 従って、本発明の課題は、トロンボポエチンと同様の生理作用を有する低分子量の化合物を提供することにある。また、本発明の別の課題は、上記の特徴を有する化合物を有効成分として含む医薬を提供することであり、より具体的には、巨核球による造血過程の異常に起因する疾患、例えば血小板減少症などの治療や予防に有用な医薬を提供することが本発明の課題である。本発明のさらに別の課題は、上記の特徴を有する化合物を用いて巨核球による造血過程の異常に起因する疾患を治療する方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、ファージランダムペプチドライブラリーからトロンボポエチンレセプターに親和性を有するファージを見いだした。また、このファージDNAにより新規なオリゴペプチドが発現されること、並びに該オリゴペプチドがトロンボポエチンレセプターを発現する細胞の増殖を刺激することを見いだした。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【0006】 すなわち本発明は、アミノ酸配列：H-Leu-Gln-Gly-Cys-Thr-Leu-Arg-Ala-Trp-Arg-Ala-Gly-Met-Cys-OHにより特定されるペプチド、又は該アミノ酸配列中に含まれる2個のシステイン残基がジスルフィド結合した環状構造のペプチドを提供するものである。また、

トロンボエチンレセプターに親和性を有する上記ペプチドも本発明により提供される。さらに、上記アミノ酸配列において1若しくは2以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／若しくは欠失が存在しており、かつ、トロンボエチンレセプターに親和性を有するペプチド、又は該ペプチドに含まれるシステイン残基から選ばれる2個のシステイン残基がジスルフィド結合した環状構造のペプチドも本発明により提供される。

【0007】本発明の別の態様によれば、上記の各ペプチドをその部分として含み、トロンボエチンレセプターに親和性を有するペプチドも提供される。また、上記の各ペプチドをコードするポリヌクレオチド、好ましくはDNA、及び該DNAを含む組換えベクターが提供される。本発明のさらに別の態様によれば、上記の各ペプチドを有効成分として含む医薬、好ましくは上記の各ペプチドと製剤用添加物とを含む医薬組成物の形態の医薬が提供される。上記の医薬は、巨核球による造血過程の異常に起因する疾患、例えば血小板減少症などの治療や予防に有用である。また、上記の医薬、好ましくは医薬組成物の製造のための上記各ペプチドの使用；並びに、化学的手法及び／又は生物学的手法（例えば、上記の形質転換体を培養して培養物から上記各ペプチドを分離・採取する工程を含む手法）により上記の各ペプチドを製造する方法も提供される。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明のペプチドは、H-Leu-Gln-Gly-Cys-Thr-Leu-Arg-Ala-Trp-Arg-Ala-Gly-Met-Cys-OHで表されるアミノ酸配列(I)で特定される（上記配列中、左側末端はN末端、右側末端はC末端を表し、構成アミノ酸残基は通常の3文字標記で表現してある）。上記配列において、アミノ酸残基はL-又はD-アミノ酸残基のいずれかを示し、好ましくはL-アミノ酸残基を示す。本発明の上記ペプチドは2個のシステイン残基を有しており、これらがジスルフィド結合することにより環状構造を形成する場合がある。本発明の範囲には、このような環状ペプチドも包含されることはいうまでもない。いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明のペプチドが所望の生理活性を発現するためには上記の環状構造が必須である可能性があり、従って、上記の環状構造のペプチドは本発明の特に好ましい態様である。

【0009】上記アミノ酸配列(I)で特定される本発明のペプチドは、トロンボエチンレセプターに親和性を有することを特徴としている。本発明のペプチドには、上記の特定のペプチドの他、アミノ酸配列(I)において1又は2以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び／又は欠失が存在しており、かつ、実質的にトロンボエチンレセプターに親和性を有するペプチドも包含される。置換及び／又は挿入される1又は2以上のアミノ酸の種類は特に限定されないが、L-アミノ酸であることが好ましい。1又は2以上のアミノ酸残基による置換、挿

入、及び／又は欠失が存在するペプチドが、実質的にトロンボエチンレセプター親和性を有しているか否かは、実施例に記載された方法に従って当業者が容易に確認することが可能である。

【0010】具体的には、本発明のペプチドのトロンボエチンレセプター親和性については、BaF/mp1細胞増殖を指標としてトロンボエチン様活性の有無の判定を行うことにより確認することができる。例えば、ヒト・トロンボエチンレセプター(Isabelle Vigonら、Proc. Natl. Acad. USA, Vol. 89, pp.5640-5644)のすべてのアミノ酸残基(1-635)をコードする遺伝子を安定に発現し、トロンボエチン依存の増殖を示すようになった細胞、例えば、de Sauvageらの方法(de Sauvageら、Nature, 369, 533, 1994)のBaF/mp1細胞を作製し、その細胞増殖をトリチウムチミジンの取り込みで測定すればよい。なお、本発明のペプチドのトロンボエチンレセプターに対する親和性については、その強弱は特に限定されないが、例えば、アミノ酸配列(I)で特定されるペプチドと実質的に同程度の親和性及び生理作用を有することが好ましい。

【0011】本発明のペプチドには、上記の各ペプチドをその部分配列として含み、実質的にトロンボエチンレセプターに親和性を有するペプチドも包含される。例えば、上記のアミノ酸配列により特定されるペプチドのN末端及び／又はC末端には1個又は2個以上のアミノ酸が結合していてもよく、好ましくは、2個以上の任意のアミノ酸から構成される任意のオリゴペプチドが結合していてもよい。このようなアミノ酸の種類は特に限定されないが、L-アミノ酸から選択されることが好ましい。一例を挙げれば、上記のペプチドのN末端に1~10個程度、好ましくは5~7個、特に好ましくは6個のL-ヒスチジンをタグ配列として結合したものは、精製効率などの観点から好ましいペプチドである。

【0012】本発明の上記ペプチドは遊離形態であってもよいが、塩酸塩、酢酸塩、若しくはパラトルエンスルホン酸などの酸付加塩、又はアンモニウム塩若しくは有機アミン塩などの塩基付加塩として提供されてもよい。従って、本明細書においてペプチドという場合には、上記のような塩の形態のペプチドを包含する意味に解釈されるべきである。また、上記の各ペプチドに任意の糖類（単糖、二糖、オリゴ糖、若しくは多糖）が結合したものや脂質類などが結合したもののほか、リン酸化されたものも本発明の範囲に包含される。

【0013】本発明のペプチドは、ペプチド合成に通常用いられる固相法および液相法などの化学的手法により合成することができる。ペプチド合成におけるアミノ基等の保護基および縮合反応の縮合剤としては、例えば：鈴木紘一編「タンパク質工学—基礎と応用」（1992年、丸善株式会社）；ボンダンスキーら著「ペプタイド・シンセシス」（1976年、John Wiley & Sons, N.Y.）；及び

スチュワートら著「ソリッド・フェーズ・ペプチド・シンセシス」(1969年, W.H. Freeman and Co., San Francisco)等に記載されたものを用いることができる。固相法では市販の各種ペプチド合成装置を利用することができる。

【0014】また、本発明のペプチドは、通常の遺伝子発現操作等の生物学的手法に従って、本発明のペプチドをコードするDNA配列を含む組み換えベクターを用いて、該ベクターにより形質転換された微生物(形質転換体)を調製し、該形質転換体を培養した培養物から所望のペプチドを分離・精製することにより製造可能である。本発明のペプチドの製造方法は上記の化学的手法及び生物学的手法に限定されることはない。

【0015】以下、本発明のペプチドを生物学的手法に従って製造する方法を説明する。ファージランダムペプチドライブラリーの種類及び調製方法は特に限定されず、公知の方法(西徹ら、実験医学, Vol. 11, No. 13, p. 1759-1764)で作製したものを用いればよいが、市販のファージランダムペプチドライブラリー、例えば、Thep SKAN Phagemid Display System (MOLECULAR BIOLOGISCHE TECHNOLOGIE社製)などを購入して用いてもよい。

【0016】トロンボポエチンレセプターに対して親和性を有するファージのスクリーニングとしては、G. P. Smithらの方法(G. P. Smithら、Methods in Enzymology, Volume 217, pp. 228-257)で行えばよい。すなわち、ヒト・トロンボポエチンレセプター(h-MPL: Isabelle Vigonら、Proc. Natl. Acad. USA, Vol. 89, pp. 5640-5644)のアミノ酸残基(1-491)をコードする遺伝子を発現させて得られるトロンボポエチンレセプターの細胞外ドメインを含むタンパク質をマイクロタイター平板ウェルプレートに固定し、このトロンボポエチンレセプターに結合したファージを検出すればよい。

【0017】より詳細に説明すると、まず、ヒト・トロンボポエチンレセプターのうち、トロンボポエチンレセプターに親和性を持つ因子との結合に関与していると考えられる細胞外領域タンパク質を取得する。その際、該タンパク質のN末端やC末端側に精製の簡便化のために特定のタンパクを融合させることが好ましい。このようなシステムとしてヒトIgGのFc領域などを挙げることができる。つぎに、トロンボポエチンレセプターのcDNA配列の情報に基づいて、トロンボポエチンレセプターの細胞外ドメイン(アミノ酸残基1-491)をコードするDNAを取得する。この際、PCR(Polymerase Chain Reaction)法によれば、所望のDNAを容易に取得できる。

【0018】例えば、トロンボポエチンレセプターはヒト胎児肝、骨髄、及び血小板等で発現していることが知られているので(Nassiss Methiaら、Blood, Vol. 82, No. 5, pp. 1395-1401, 1993)、トロンボポエチンレセプターの1-491番目のアミノ酸配列に基づいたセンスプライマーオリゴヌクレオチドとアンチセンスプライマーオリ

ゴヌクレオチドとを作製し、これらのプライマーを用いてPCRを行うことによってトロンボポエチンレセプターの細胞外領域をコードするDNAを増幅することができる。また、例えばヒトIgG Fc領域を付加する場合には、トロンボポエチンレセプターの細胞外領域タンパク質のC末端の読み枠が一致するように、ヒトIgG Fc領域アミノ酸をコードするDNAのアンチセンスDNAをMPL細胞外領域タンパク質のアンチセンスプライマーに読み枠が一致するように連結したプライマーを用いればよい。

【0019】この様にして得られたトロンボポエチンレセプターcDNA、例えばヒトIgG Fc領域と融合したトロンボポエチンレセプター細胞外領域タンパク質(以下、本明細書において「MPL-IgG」と略記する場合がある)をコードするDNA断片を取得し、ベクター中にそのDNA断片を組み込んで該DNA発現用の組換えベクターを製造することができる。ベクターの種類は、該DNAを動物細胞、植物細胞、又は微生物細胞などにおいて発現させることができるものであれば特に限定されない。例えば、ベクターとしてプラスミドを用いる場合には、大腸菌内で増幅可能で、さらに動物細胞でも発現可能な動物細胞用の発現プロモーターを有しているプラスミドを好適に使用することができる。

【0020】例えば、発現プロモーターとしては、シミアンウイルス(SV40)由来プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)由来プロモーター、アデノウイルス後期プロモーターなどを挙げることができる。さらに、該プラスミドは、SV40複製開始点(ori)又はポリオマーウイルスoriなどを有していることが好ましい。このようなプラスミドとしては、例えば、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pCDM8 (Invitrogen社製)、pCR3 (Invitrogen社製)などを挙げることができる。

【0021】上記の組換えベクター、好ましくは組換えプラスミドを動物細胞、例えばサル腎由来細胞であるCO S-7、ヒト胎児腎由来細胞293などに導入し、該DNA断片の遺伝子産物であるタンパク質、好ましくは上記のMPL-IgGを培養物中、好ましくは培養上清中に発現させることが可能である。このようにして得られた培養物中の発現タンパク質、好ましくはMPL-IgGは、該タンパク質に対して親和性を有するリガンドを固定した担体を用いたカラムクロマトグラフィーなどを用いて分離・精製することが可能である。MPL-IgGの場合には、Protein GまたはProtein Aを固定した担体、例えばHiTrap Protein G (ファルマシア社製)などを用いたカラムクロマトグラフィーにより、発現したタンパク質を容易に精製することができる。ついで、このようにして発現させたタンパク質をマイクロタイター平板のウェル内に固定すればよい。

【0022】固定したMPL-IgGなどを用いて該タンパク質に特異的に結合するファージクローンを選択する方法は、例えばG. P. Smithらの方法(G. P. Smithら、Me

thods in Enzymology, Vol. 217, pp. 228-257) によって得ることができる。例えば、ファージペプチドライブラリーをマイクロタイター平板ウェルに固定したMPL-IgGに加えて室温でインキュベートした後、よく洗浄して非特異的に結合したファージを除き、ついで、強酸を用いて固定したMPL-IgGに結合したファージを溶出することができる。このファージをアルカリで中和した後、大腸菌に感染させることによってMPL-IgGに特異的に結合するファージクローンを増幅させることができる。

【0023】この感染大腸菌を終夜培養した培養上清から、ポリエチレングリコール沈殿によりファージを取得することが可能である。この増幅したファージを用いて同様のスクリーニングを繰り返すことにより、例えばMPL-IgGと強い結合を示すファージを濃縮することができる。

【0024】上記方法で得られたテトラサイクリンプレート上の大腸菌コロニーを培養することにより、例えばMPL-IgGに結合する可能性のあるファージを容易に調製することができる。例えば、テトラサイクリンプレート上の大腸菌コロニーを終夜培養し、その培養液を遠心し、その上清をポリエチレングリコール沈殿に付することによりファージを調製できる。得られたファージクローンは例えばMPL-IgGに結合するか否かは、このファージを認識する抗体を利用したELISA法により判定することができる。例えば、HRP/Anti-M13 conjugate (ファルマシア社製)を用いて、最終的にMPL-IgGに親和性を持つペプチドをコードしているファージクローンを得ることができる。

【0025】このようにしてMPL-IgGへの結合が確認できたファージクローンから ss Phage DNA Spin Kit (BI 0101 社製)等を用いて選別されたファージ由来の一本鎖DNAを取得できる。例えばMPL-IgGに結合することが確認できたファージDNAから、例えばサンガーらの方法(Sanger, F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977)によってランダムDNA領域を決定することができる。このDNA領域の配列より、ファージクローンが特異的に提示するアミノ酸配列を容易に推定することができる。

【0026】なお、本明細書に記載されているファージ、DNA、組換え体宿主としての大腸菌の取り扱いに必要な一般的な操作は当業者に周知であり、例えば、Maniatisらの実験書(T. Maniatisら, Molecular cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)に記載されている。使用する酵素、試薬類は全て市販の製品を用いることができ、通常は、製品で指定された条件に従えば完全にそれらの目的を達成することができる。本発明のペプチドを生物学的手法に従って製造する方法については、上記の一般的な説明に加えて、本明細書の実施例に具体的かつ詳細に説明されているが、本発明のペプチドを生物学的手法に従って製造する方法

はこれらに限定されることはない。

【0027】上記のアミノ酸配列(I)により特定されるペプチドをコードするDNAを用いて、アミノ酸配列(I)において1又は2以上のアミノ酸残基による置換、挿入、及び/又は欠失が存在するペプチドを容易に製造することが可能である。例えば、上記のDNAを含む組換えベクターを導入した大腸菌などの形質転換体をN-ニトロ-N'-ニトロ-N''ニトロソグアニジンなどの薬剤を用いて突然変異処理し、菌体から遺伝子DNAを回収することによって得ることができる。また、前記DNAを亜硝酸ナトリウム等の薬剤で直接処理してもよい。さらに、例えば、部位特異的変異法(Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350, 1987)、「PCR実験マニュアル」(1991年, HJB 出版局)第155~160頁に記載されているリコンビナントPCR法、「実験医学増刊 Vol. 8, No. 9」(1990年, 羊土社)第63~67頁に記載されたPCRを用いた変異遺伝子の作成法などを利用することができる。

【0028】本発明のペプチドは、巨核球による造血過程の異常に起因するヒトを含む哺乳類の疾患、とりわけ血小板減少を伴う疾患の治療や予防に有用である。このような疾患としては、例えば、ガン化学療法及び/又はガン放射線療法に伴う血小板減少、骨髄移植、手術、及び重症感染症などによる血小板減少、あるいは消化管出血などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。血小板減少を伴う代表的な疾患である再生不良性貧血や突発性血小板減少性紫斑病なども本発明の医薬の適用対象である。

【0029】本発明の医薬としては、上記の各ペプチドから選ばれる1又は2種以上のペプチドをそのまま用いてもよいが、通常は、製剤学的に許容しうる1又は2種以上の製剤用添加物を用いて上記ペプチドの1又は2種以上を有効成分として含む医薬組成物を製造し、上記の疾患の治療及び/又は予防のために用いることが好ましい。溶解度、吸収及び排泄などの体内動態、及び/又は製造方法などの観点から、上記ペプチドは生理学的に許容される塩の形態であってもよい。上記の医薬組成物の投与経路としては、例えば、静脈内投与、直腸内投与、経口投与などの全身投与の他、外用、点眼、点鼻、点耳、局所注射などの局所投与を挙げることができる。

【0030】例えば、静脈内投与用注射剤若しくは点滴剤などの全身投与剤は本発明の医薬組成物の好ましい形態である。有効成分をリポソームなどに封入した医薬組成物や抗体などを結合した医薬組成物を用いることにより、特定の標的器官に対する親和性や選択性を改善することができる場合がある。もっとも、投与経路は適用対象となる疾患の種類、治療又は予防の目的、患者の状態などに応じて適宜選択可能であり、それぞれの投与経路に好適な製剤形態も適宜選択できることはいうまでもない。

【0031】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

例1：ファージベクターDNAの調製

fUSE5 ファージ（コロンビア大学 G. P. Smith教授から入手可能である）から得たfUSE 5 DNAを材料として、G. P. Smithらの方法（G. P. Smithら、Science, Vol 249, pp.386-390, 1990）に基づいてファージランダムペプチドライブラリーを作製した。試薬、酵素は市販のものを用い、鋳型合成DNAと5'末端ビオチン化合成プライマーDNAは東亜合成化学が作製したものをを用いた。

【0032】すなわち 30 μ g のfUSE 5 DNAを SfiI (120 units、東洋紡社製)で50℃で約19時間反応した。反応液をフェノール/クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出し、DNAをエタノール沈殿させた。得られたDNAを滅菌水に溶解した後、再度同様に SfiI (80 units、東洋紡社製)を用いて切断した。反応液をフェノール/クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出し、DNAをイソプロパノール沈殿させ、得られたDNAを滅菌水に溶解した。

【0033】例2：ランダムインサートDNAの調製
5 μ g の5'末端ビオチン化合成プライマー 5'-ACTCGGCCGACGGGGC-3' と5 μ g の5'-TTCGGCCCCAGCGGCCCC-3' とをプライマーとして用い、1 μ g の鋳型合成DNA 5'-ACTCGGCCGACGGGGCT(NNK)₁₅GGGGCGCTGGGGCCGAA-3'を用いてPCR法によりDNAを増幅した。PCRにはTaq DNAポリメラーゼ（Promega社製）を用い、添付の反応バッファーを使用した。1サイクルを95℃で2.5分間、50℃で4分間、72℃で2.5分間とし、計5サイクルの増幅を行い、最後に72℃で5分間処理した。このPCR産物をエタノール沈殿させ、得られたDNAをBglI (2500 units、東洋紡社製)を用いて37℃で19時間処理した。その後、DYNA beads M-280 (DYNAL社製)を用いて添付のプロトコールに従いビオチン化DNAフラグメントを除去し、溶液をフェノール/クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出した後、DNAをイソプロパノール沈殿させた。得られたDNAを滅菌水に溶解してランダムインサートDNAとした。

【0034】例3：ファージベクターDNAとランダムインサートDNAのライゲーション

例1で得た7.45 μ g のSfiI切断fUSE5 DNAと例2で得た0.2 μ g のランダムインサートDNAとを、22.5 unitsのT4 DNA ligase (Promega社製)を用いて10℃、6時間処理した。この反応液に0.2 μ g のランダムインサートDNAと22.5 unitsT4 DNA ligaseとを加え、さらに10℃で14時間反応させた。反応液をフェノール/クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出した後、DNAをエタノール沈殿させた。得られたDNAを滅菌水に溶解した後、ミリポアフィルターウルトラフリーC3(ミリポア社製；商品名)

を用いて限外濾過し、得られた溶液をファージランダムペプチドライブラリー作製に用いるまで-20℃で保存した。

【0035】例4：ファージランダムライブラリー作製
ライブラリー作製に際して、大腸菌の形質転換にはエレクトロポレーション法を用いた。市販の導入装置 GENE-PULSER (Bio-Rad社製)を用い、添付のプロトコールに従って、0.2 cmキューベットを用いて25 microfarad, 2500V, 400 ohmでパルスを加えることにより、大腸菌 MC1061株（コロンビア大学 G. P. Smith教授から入手可能である）に例3で得たDNAを導入してライブラリーを作製した。パルスを印加した溶液を速やかに0.2 μ g/mlのテトラサイクリン（和光純薬社製）を含む2.0 mlのSOC培地を加え、37℃で60分間培養した。この培養液を10形質転換ごとに37℃に保温したNZY培地（200 ml）に添加した。

【0036】20 μ g/mlテトラサイクリンと50 μ g/mlのストレプトマイシン（和光純薬社製）を含むNZY寒天培地プレートに上記の培地希釈液200 μ lをまき、37℃で終夜培養した。プレート表面に生じたコロニー数から、このファージ培養液は約 1×10^9 個のクローンを含むと推定された。このファージ培養液から、ポリエチレングリコール沈殿、CsCl超遠心を用いる方法で高濃度のファージを取得した。このファージランダムペプチドライブラリーを大腸菌に感染させ、さらにファージを増幅させた。具体的には、大腸菌 K91Kan株の培養液にファージランダムペプチドライブラリーを加え、終夜培養した培養液からポリエチレングリコール沈殿、CsCl超遠心を用いる方法で高濃度の増幅ファージライブラリーを取得した。

【0037】例5：ファージのタイターの測定法
ファージのタイターはテトラサイクリン耐性ユニットであるTU/mlで算出した。大腸菌K91 Kan株のコロニーを5 mlの100 μ g/mlカナマイシン（和光純薬社製）を含むNZY又はLB培地で一晚培養した後、この培養液0.2 mlを20 mlの100 μ g/mlカナマイシンを含むTerrific brothを用いて37℃で約3時間培養した。この大腸菌20 μ lとファージ希釈液20 μ lとをチューブ内で混合し、室温で10分間放置した。この混合物に0.2 μ g/mlテトラサイクリンを含む1.96 ml NZY又はLB培地を加えて37℃で約40分間にわたり振とう培養器で培養した。培養液100 μ lを40 μ g/mlテトラサイクリンと100 μ g/mlカナマイシンとを含むNZY又はLBプレートにまき、37℃で終夜培養した。プレート上のコロニーを数え、プレートに1コロニー生じた時のファージのタイターを 1×10^3 TU/mlとした。

【0038】例6：ヒトMPL発現プラスミドの構築
まず、ブラックハイブリダイゼーション法により、MPL cDNAの全領域を保持するファージクローンを得た。この目的のために、PCR法によりヒト胎児cDNA(CLONTECH社

製)からヒトMPL cDNAの一部を取得した。なお、MPL cDNAの開始コドンから終止コドンはM90102として、開始コドンの上流の配列は X73551 としてそれぞれGenBankに登録されており、いずれの配列情報も利用可能である。

【0039】PCRのためのプライマーとしては、MPLの開始コドンのAから数えて331塩基から350塩基の配列に基づいたセンスプライマー 5'-GTGCGTCTCTTCTTCGCT-3' と 1888 から 1907 塩基配列に基づいたアンチセンスプライマー 5'-TCAAGGCTGCTGCCAATAGC-3' とを用いた。PCRは TaKaRa EX Taq (宝酒造社製)と添付の反応バッファーとを用いて通常の条件で行った。このPCR産物をアガロースゲル電気泳動に付した後、SUPREC-01 (宝酒造社製)を用いて添付のプロトコールに従ってゲルからPCR産物を回収した。

【0040】Rediprime DNA labelling system (アマシヤム社製)を用いて、上記のPCR産物を添付のプロトコールに従って [α - 32 P] dCTPでラベルしてプローブとした。このプローブを用いて、Human Fetal Liver 5'-STR ETCH cDNA library (CLONTECH 社製)から添付のプロトコールに従ってMPL cDNAのコーディング全領域と少なくとも開始コドンより上流の60塩基以上の領域とを保持するファージクローンを単離し、常法に従ってファージを調製した。

【0041】つぎに、PCR法によりヒトMPL細胞外領域cDNA (1から491番目のアミノ酸配列)をコードするDNAを取得した。PCRのための鋳型としては上記で得られたファージを用い、プライマーとしてMPLの開始コドン上流28から12塩基の配列に基づいたセンスプライマー5'-CTAAGGCAGGCACACAG-3' と 485-491 番目のアミノ酸配列に基づいたアンチセンスプライマー5'-GGTGACCCAGGCGGTCTCGGTGGC-3' とを用いた。この際、MPL細胞外領域タンパク質のC末端領域がヒトIgG Fcと連結できるようにBstEIIサイトを導入し、さらに読み枠が一致するように設計した。

【0042】また、ヒトIgG Fc領域cDNAはB. D. Bennettらの文献 (B. D. Bennettら、J.B.C, Vol 266, p. 23060-23067, 1991)を参考にして、センスプライマー 5'-CGCGGTACCCGACAAAACCTCA-3' とアンチセンスプライマー 5'-GCACTCATTTACCCGAGACAGGGAGA-3' とを用いてヒト脾臓のQUICK-CLONE cDNA (CLONTECH 社製)を材料としてPCR法により取得した。このようにして得られたPCR産物を以下に述べる工程に従ってpCR3 (Invitrogen 社製)に導入し、MPL発現用の組換えベクターを構築した。

【0043】PCRで得られたMPL細胞外領域cDNAとヒトIgG Fc領域cDNAとを、EUKARYOTIC TA CLONING KIT (Invitrogen 社製)を用いて、添付のプロトコールに従ってそれぞれ別個にpCR3哺乳細胞発現ベクターに挿入した後、大腸菌TOP10に形質転換した。得られた形質転換体のうち、発現可能な正しい方向に挿入された株を選び、

この株を常法に従って大量培養した。この株から、常法に従いプラスミドを調製し、それぞれMPL(B)-pCR3及びIgG Fc(B)-pCR3と命名した。

【0044】約200 μ gのMPL(B)-pCR3を0.64 unitsのBstEII (東洋紡社製)と200 unitsのScaI (宝酒造社製)で切断した後、この断片をアガロース電気泳動に付した。MPL cDNA領域を含む約3085 bpのDNA断片を含むゲル断片を切り出し、ゲルから常法に従ってDNAを抽出した。また、約20 μ gのIgG Fc(B)-pCR3を40 unitsのBstEII (東洋紡社製)及び80 unitsのScaI (宝酒造社製)で切断した後、アルカリフォスファターゼ (東洋紡社製)で脱リン酸化してアガロース電気泳動に付した。IgG Fc領域cDNAを含む約4150bpのDNA断片を含むゲル断片を切り出し、ゲルからDNAを抽出した。

【0045】MPL cDNA領域を含む約3085 bpのDNA断片 (約30 ng)とIgG Fc領域cDNAを含む約4150bpのDNA断片 (約20 ng)とを4.6 unitのT4 DNAライゲース (東洋紡社製)で連結させた。ついで、例3と同様の方法に従い、得られたDNAをエレクトロポレーション法により大腸菌XLI-Blue株 (Stratagene社製)に導入した。得られた形質転換体のうち、発現可能な正しい方向に挿入された株を選び、この株を常法に従って大量培養した。この株から、常法に従ってプラスミドを調製し、MPL-IgG Fc(B)/pCR3と命名した。

【0046】例7:ヒトIgG Fc領域融合ヒトMPLタンパク質(MPL-IgG)を安定に発現するヒト胎児293細胞の作製と精製

例6で得たMPL-IgG Fc(B)/pCR3を用いて、エレクトロポレーション法 [渡辺良成「組織培養の技術」、日本組織培養学会編、pp. 501-503, 1996]により293細胞を形質転換した。形質転換された293細胞を10% FCS含有DME M培地で約2日間培養した後、0.4 mg/ml ジェネティシン (LIFE TECHNOLOGIES 社製)を含む10% FCS含有DME Mで約2週間培養して形質転換体を得た。この形質転換体を約50% コンフルエントになるまで培養し、さらに1% ニュートリドーム (ペーリンガー・マンハイム社製)を含むDMEM培地と交換して培養を継続した。約1週間ごとに培地を交換しながら3週間から4週間培養を継続した。得られた培養物を遠心して培養上清を回収した後、VacuCap (Gelman Sciences 社製)を用いて濾過した。HiTrap Protein G (ファルマシア社製)を用いて、約7リットルの培養上清を添付のプロトコールに従ってカラムクロマトグラフィーに付し、MPL-IgGを精製した。

【0047】例8:MPL-IgGのELISAによる定量
100 μ lのPBS (-)中で1.2 μ g/mlの希釈ヤギ抗ヒトIgG Fc領域認識抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories社製)を用い、マイクロタイター平板ウェルを室温で8時間以上被覆した。200 μ lのPBS (-)でウェルを洗浄した後、200 μ lのPBS (-)中に溶解した1% BSA

を室温で8時間以上反応させてウェルをさらに被覆した。ついで、200 μ l の0.05% Tween20 を含む PBS(-) でウェルを洗浄した後、100 μ l の精製MPL-IgG 溶液を加えて室温で2時間以上インキュベートした。

【0048】200 μ l の0.05% Tween20 を含むPBS(-)でウェルを洗浄した後、ウェルに100 μ l のPBS(-)で5万倍希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG Fc領域認識抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories社製)を加えて室温で2時間以上インキュベートした。200 μ l の0.05% Tween20 を含むPBS(-)でウェルを洗浄した後、100 μ l のTMB 溶液(DAKO 社製)を加えて室温で5分間インキュベートした。100 μ l の 1M H_2SO_4 (和光純薬社製)を加えて反応を停止した。このELISA でヒトIgG (CHEMICON INTERNATIONAL 社製)を用いて20-300 ng/ml の範囲にある既知濃度を連続プロットして標準曲線を描いた。光学密度を450nm で読出し、適当な標準曲線に対してMPL-IgG をヒトIgG Fc領域当量として定量した。

【0049】例9：MPL-IgG 結合ファージのスクリーニング

(1) ファージのスクリーニング

マイクロタイター平板ウェルにPBS(-)で希釈した100 μ l のMPL-IgG 10 μ gを加えて4℃で終夜被覆した。さらに、175 μ l のPBS(-)/0.1% BSAを固定液に上乗せするように添加して、4℃で終夜被覆した。200 μ l のPBS(-)/0.1% BSA/0.05% Tween 20 でウェルの底面を洗浄した。100 μ l の増幅ファージライブラリー溶液をウェルに添加し、室温で3時間インキュベートした。ファージ溶液をピペットで吸い取り、200 μ l のPBS(-)/0.1% BSA/0.05% Tween 20 でウェルの底面を洗った。100 μ l の0.1M HCl-glycin (pH 2.2)/0.1% BSA/0.05% Tween 20 を添加して室温で15分間放置した。ウェル内の液を回収し、18.75 μ l の1M Tris (pH 9.1)を加えて中和した。

【0050】(2) 回収ファージの測定

K91 Kan 株のコロニーの1個を5 ml の100 μ g/mlカナマイシンを含む LB 培地中で振とう培養器を用いて37℃で一晩培養した。100 μ g/mlカナマイシンを含む20 mlのTerrific broth中で、K91 Kan 培養液0.2 mlを37℃で約3時間振とう培養した。その後、5分間室温で静置した。上記の(1)で回収したファージと等量のK91Kan 培養液を混合し、室温で10分間放置した。0.2 μ g/mlテトラサイクリンを含む40 mlのLB 培地に混合液を入れ、37℃で40分間培養した後、40 mg/ml テトラサイクリンを20 μ l 加えて1晩しんとう培養した。培養液をポリエチレングリコール沈殿して増幅ファージを得た。例5のファージのタイターの測定法に従ってタイターを測定した。

(3) 2回目以降の操作は、前回のスクリーニングでの回収ファージを増幅したファージ(10^{11} ~ 10^{12} TU/ml)を

用いて、工程(1)及び(2)に従って行った。この操作を3~4回繰り返すことにより、MPL-IgG 結合ファージクロンを濃縮した。濃縮したファージの中にはMPL-IgG に親和性を示すペプチドを提示するファージが含まれており、そのペプチドはそのランダムDNA にコードされた塩基配列によるものと考えられる。

【0051】例10：MPL-IgG に結合可能性のあるファージクロンの調製及びファージ本鎖DNA 取り

例8のプレートで得られた大腸菌 K91Kan のコロニーより、ファージクロン及び一本鎖DNA の調製を行った。得られたプレートのコロニーを40 μ g/mlテトラサイクリンと100 μ g/mlカナマイシンを含む LB 培地で8時間以上培養した。培養液のポリエチレングリコール沈殿を行ってファージを調製した。このファージを MPL-IgGに結合可能性のあるファージクロンとし、下記の ELISA 法に従ってその結合性を測定した。ssPHAGE DNA Spin Kit (BIO101社製)を用い、添付のプロトコールに従ってファージ一本鎖DNA を調製した。

【0052】例11：ELISA 法による MPL-IgG結合ファージの同定

マイクロタイター平板プレートのウェルにPBS(-)で希釈した各100 μ l の1 μ g のMPL-IgG 又はヒトIgG (CHEMICON INTERNATIONAL 社製)を加えてウェルを4℃で終夜被覆した。溶液を除いた後、200 μ l のPBS(-)-1% BSAを添加して室温でウェルをさらに約2時間被覆した。例10で調製した100 μ l のファージをMPL-IgG 又はヒトIgG を固定したそれぞれのウェルに加え、室温で約2時間以上インキュベートした。200 μ l の0.05% Tween20 を含むPBS(-)でウェルを洗浄した後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗M13 ファージ抗体 (ファルマシア社製)を加えて室温で1時間以上インキュベートした。

【0053】200 μ l の0.05% Tween20 と1% BSA とを含むPBS(-)でウェルを洗浄した後、100 μ l のTMB 溶液 (DAKO社製)を加えて室温でさらに5分間インキュベートした。100 μ l の1M H_2SO_4 (和光純薬社製)を加えて反応を停止した。光学密度を450 nmで測定し、MPL-IgG の光学密度がIgG の光学密度に比べて2倍以上高いファージ溶液をMPL-IgG 結合ファージクロンとした。このようにしてMPL-IgG に結合するファージが同定された。本発明のペプチドを有するファージのMPL-IgGに対する親和性をELISA 法で測定した結果を図1に示す。ネガティブコントロールとしては、ランダムペプチドを発現しないM13 ファージを用いた。

【0054】例12：MPL-IgG 結合ファージクロンの塩基配列の解析

ファージのランダムDNA 領域から下流約60塩基の位置に、ファージ一本鎖DNAと相補的なプライマー5'-TGAATT TTCTGTATGGGG-3'を作製した。Sequenase Version 2.0 7-deaza-dGTP DNA sequencing Kit (アマシヤム社製)を用い、このプライマーにより、添付のプロトコールに

従って例10で取得したファージ一本鎖DNAのランダムDNAの塩基配列を確認した。この塩基配列の情報から、ファージのランダム領域のアミノ酸配列を決定した。そのアミノ酸配列は Leu-Gln-Gly-Cys-Thr-Leu-Arg-Ala-Trp-Arg-Ala-Gly-Met-Cysであった。

【0055】例13：ヒトMPL を安定に発現するBaF/mpl細胞の作製

PCR 法によりヒトMPL cDNAをコードするDNA を取得した。PCR のための鋳型として例6で得られたファージを用い、プライマーとしてはMPL の開始コドン上流28から10塩基の配列に基づいたセンスプライマー 5'-CTAAGCGA GGCACACAGTG-3' と1888から1907塩基配列に基づいたアンチセンスプライマー 5'-TCAAGGCTGCTGCCAATAGC-3' とを用いた。このようにして得られたPCR 産物を以下にのべる工程に従って pCR3 (Invitrogen 社製) に導入して、MPL 発現用の組換えベクターを構築した。

【0056】EUKARYOTIC TA CLONING KIT (Invitrogen 社製)を用い、添付のプロトコールに従って上記のPCR 産物 MPL cDNA を pCR3 哺乳細胞発現ベクターに挿入した後、該組換えベクターを大腸菌TOP10 に導入した。得られた形質転換体のうち、発現可能な正しい方向に挿入された株を選び、この株を常法に従って大量培養した。

液体クロマトグラフィーの条件

カラム：Kromasil 100 C18, 5 μ m, 125 \times 4 mm

温度：20 $^{\circ}$ C

流速：0.75 ml/min

溶離液：Buffer A: 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

Buffer B: 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液/アセトニトリル (20/80)

【0058】例15：BaF/mpl 細胞増殖を指標としたトロンボポエチン様活性試験

50 μ M 2-MEを含む10% FCS 含有 RPMI1640 培地にmIL-3 非存在下でBa/F3 細胞又はBaF/mpl 細胞を 5×10^5 cells/mlの密度で細胞培養用シャーレに蒔き込み、5% CO₂ 雰囲気下で37 $^{\circ}$ Cで1日間培養した。翌日、細胞を 2.5×10^4 cells/ウェルの密度で96穴プレートに植え込み、例14で製造した合成ペプチド (1 nM~10 μ M)を加えて1日間培養した。翌日、0.5 μ Ci/ ウェルのトリチウムチミジン(NEN社製)を添加し、さらに6時間培養した。

【0059】細胞をセルハーベスターでGF/Bフィルター(ワットマン社製)上に回収し、得られた細胞を200 μ l のPBS(-)で10回洗浄した後、3ml のアクアゾールII(NEN社製)の存在下で液体シンチレーションアナライザー(PACKARD社製)で放射活性を測定した。3 U/ml mIL-3 (Genzyme 社製)存在下でのチミジン取り込み量を100%とし、細胞非存在下をブランクとして細胞増殖活性を評

この株から、常法に従ってプラスミドを調製した。上記で得たプラスミドを用いて、エレクトロポレーション法によりIL-3依存性マウスプロB細胞由来Ba/F3細胞を形質転換した。形質転換されたBa/F3 細胞を5 u/ml mIL-3 (Genzyme 社製)、50 μ M 2-MEを含む 10% FCS含有 RPMI1640 培地で約1日間培養した後、0.8mg/ml ジェネティシン(LIFE TECHNOLOGIES 社製)を含む選択培地で約2週間培養して形質転換体を得た。この形質転換体がトロンボポエチン依存性になっていることを市販のリコンビナントヒトTPO (R&D社製)により確認し、BaF/mpl 細胞と命名した。

【0057】例14：合成ペプチドの作製

ファージペプチドライブラリーから得られたペプチドの配列は Leu-Gln-Gly-Cys-Thr-Leu-Arg-Ala-Trp-Arg-Ala-Gly-Met-Cysであり、このペプチドは直鎖状構造、又は二個のシステイン残基がジスルフィド結合した分子内環状構造の二形態を取り得る。直鎖状と環状の二種のペプチドを固相法で合成し、各々を逆相HPLCで精製した(サワディ・テクノロジー社)。このペプチドの液体クロマトグラフィーにおけるリテンションタイムはそれぞれ 13.659 分(直鎖)及び 13.589 分(環状)であった。

価した結果を図2に示す。この結果から、本発明のペプチド(環状)がBaF/mpl 細胞の増殖を刺激するが、Ba/F3 細胞の増殖を刺激しないことが明らかであり、トロンボポエチン様活性を持つことが示された。

【0060】

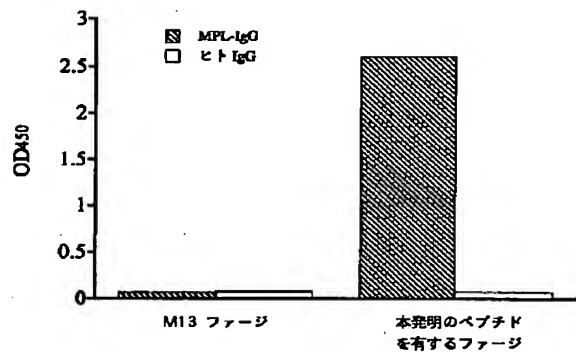
【発明の効果】本発明のペプチド化合物はトロンボポエチンレセプターに親和性を有しており、巨核球による造血過程の異常に起因する疾患、例えば血小板減少を伴う疾患の予防・治療薬の有効成分として有用である。

【図面の簡単な説明】

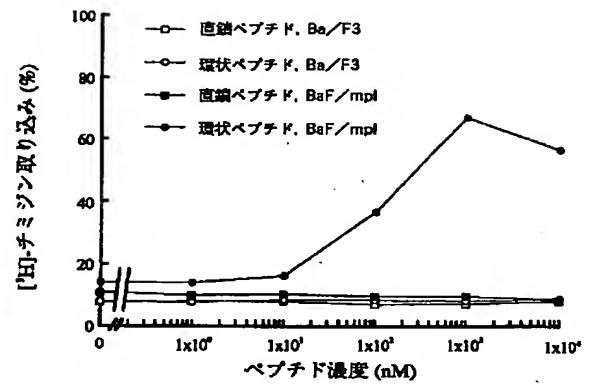
【図1】 本発明のペプチドを有するファージのMPL-IgG に対する親和性をELISA 法で測定した結果を示す図である。ネガティブコントロールは、ランダムペプチドを発現しないM13 ファージの結果を示す。

【図2】 本発明のペプチドのトロンボポエチン様活性を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 徳山 小百合
 福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
 薬株式会社内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.